

10/022241

#3

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau International

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 9/16, A61P 35/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/69413 (43) Date de publication internationale: 23 novembre 2000 (23.11.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/01315 (22) Date de dépôt International: 17 mai 2000 (17.05.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/06207 17 mai 1999 (17.05.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABO- RATOIRES DES PRODUITS ETHIQUES ETHYPHARM [FR/FR]; 21, rue Saint-Mathieu, F-78550 Houdan (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FAISANT, Nathalie [FR/FR]; Lieu-dit Liga, Route de Louvaines, F-49220 Montreuil-sur-Maine (FR). BENOIT, Jean-Pierre [FR/FR]; 45, allée des Châtaigniers, F-49240 Avrille (FR). MENEI, Philippe [FR/FR]; 5, avenue Emile Savigner, F-49240 Avrille (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regim- beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW. brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: USE OF BIODEGRADABLE MICROSPHERES THAT RELEASE AN ANTICANCER AGENT FOR TREATING GLIOBAS- TOMA (54) Titre: UTILISATION DE MICROSPHERES BIODEGRADABLES LIBERANT UN AGENT ANTICANCEREUX POUR LE TRAITEMENT DU GLIOBLASTOME (57) Abstract <p>The invention relate to the use of biodegradable microspheres that release a radiosensitizing anticancer agent for producing a medicament to be used simultaneously with, separately from, or spread over time with a radiotherapy, for treating glioblastoma. The use of said biodegradable microspheres according to the invention results in a patient survival time of least 90 weeks, a therapeutically effective concentration being maintained in the parenchymatous area throughout this time. The microspheres use preferably contain 5-fluorouracile coated with poly(d-l-lactic acid-co-glycolic acid). The microspheres are implanted in the walls of the operation site following the exeresis of the tumor, by intratissular injection. The radiotherapy targeting the tumorous mass is dosed at 60 Gy over approximately 6 weeks. The invention also relates to a method for producing the biodegradable microspheres by emulsion-extraction, and to a suspension containing the biodegradable microspheres obtained using this method.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet l'utilisation de microsphères biodégradables libérant un agent anticancéreux radiosensibilisant pour la fabrication d'un médicament destiné à être utilisé de façon simultanée, séparée ou étalée dans le temps avec une radiothérapie, pour le traitement du glioblastome. L'utilisation des microsphères biodégradables selon l'invention permet d'atteindre une durée de survie des patients d'au moins 90 semaines, en maintenant au cours du temps une concentration thérapeutiquement efficace dans l'espace parenchymateux. Les microsphères utilisées contiennent de préférence du 5-fluorouracile enrobé dans du poly(d-l-acide lactique-co-acide glycolique). Les microsphères sont implantées par injection intratissulaire, après exérèse de la tumeur, dans les parois du foyer opératoire. La radiothérapie focalisée sur le volume tumoral est dosée à 60 Gy sur six semaines environ. La présente invention concerne également un procédé de préparation des microsphères biodégradables par émulsion-extraction, ainsi qu'une suspension contenant des microsphères biodégradables éventuellement obtenues par ce procédé.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**Utilisation de microsphères biodégradables libérant un agent
anticancéreux pour le traitement du glioblastome**

5 La présente demande concerne l'utilisation de microsphères biodégradables libérant un anticancéreux, pour le traitement du glioblastome.

 Le glioblastome appartient au groupe des maladies rares répertoriées par la National Organization for Rare Disorders .

10 Les tumeurs gliales malignes sont des tumeurs primitives du système nerveux central représentant, selon les séries, 13 à 22 % des tumeurs intracrâniennes. Sur le plan histologique, on distingue en fait deux types de tumeurs gliales malignes, les astrocytomes anaplasiques et les glioblastomes, ces derniers représentant la forme la plus indifférenciée
15 de ces tumeurs.

 Il n'existe actuellement pas de traitement efficace contre les tumeurs gliales malignes. La durée de survie des patients atteints de glioblastome ne dépasse pas un an, même si l'on associe la chimiothérapie et la radiothérapie à la chirurgie.

20 Le traitement des tumeurs gliales malignes est limité principalement par trois phénomènes.

 Le premier est l'existence d'une barrière hémato-encéphalique (BHE) qui isole le système nerveux central du reste de l'organisme. Cette BHE ne laisse passer que des molécules de petite taille liposolubles. Les
25 autres molécules doivent être administrées à des doses très importantes pour atteindre le système nerveux central et ce, au prix d'effets secondaires systémiques importants.

 Le deuxième facteur limitant l'efficacité du traitement des tumeurs gliales est le caractère infiltrant de ces tumeurs. Le cerveau étant un
30 organe hautement fonctionnel, il est impossible d'y réaliser une chirurgie large au sens carcinologique du terme. L'exérèse la plus complète

possible ne sera qu'une exérèse macroscopiquement complète laissant un grand nombre de cellules tumorales infiltrées dans les parois de la cavité d'exérèse. De nombreux auteurs ont d'ailleurs montré que 90 % des tumeurs gliales malignes opérées et soignées par radiothérapie
5 récidivaient dans les deux centimètres du site tumoral initial.

Le dernier facteur limitant l'efficacité du traitement des tumeurs gliales est le faible indice thérapeutique. Les cellules tumorales s'abritent en quelque sorte derrière un tissu normal extrêmement fragile et sensible aux agressions, provoquées par exemple par la radiothérapie ou par
10 certains anticancéreux. Ainsi est-il difficile de détruire les cellules tumorales sans détruire les cellules nerveuses normales.

Les progrès réalisés dans le traitement des tumeurs gliales sont insuffisants (Kornblith PL, Walker M, Chemotherapy for malignant gliomas. J. Neurosurg, 68 : 1-17, 1988 ; Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Selker
15 RG, VanGilder JC, Robertson JT, Mahaley SM, A randomized comparaison of intra-arterial versus intravenous BCNU with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma, J. Neurosurg. 76 : 772-781, 1992).

Actuellement, le traitement classique des glioblastomes consécutif à
20 une résection chirurgicale est basé sur une radiothérapie externe. Il ne permet pas d'atteindre une durée de survie supérieure à un an. L'association d'une radiothérapie avec une chimiothérapie par la 1-(2-chloroéthyl)-3-cyclohexyl-1-nitroso-urée (BCNU) n'est efficace que sur les astrocytomes anaplasiques. Elle est d'un apport modeste car elle n'élève
25 le pourcentage des survivants qu'à dix-huit mois, sans modifier la durée de survie.

Par ailleurs, l'immunothérapie ne s'est jamais imposée et la thérapie génique doit encore faire ses preuves.

Plusieurs techniques visant à augmenter la concentration locale
30 d'anticancéreux ont été expérimentées, comme la rupture osmotique de la barrière hémato-encéphalique, l'injection dans le liquide céphalo-

rachidien, la perfusion intra-carotidienne et l'administration intra-tumorale à l'aide de réservoirs sous-cutanés (Tamargo RJ et Brem H, Drug delivery to the central nervous system, Neurosurgery Quaterly, 2 : 259 – 279, 1992). Aucune de ces techniques n'a pu augmenter la durée de survie des patients et certaines se sont révélées hautement toxiques.

Au cours de ces dernières années, la recherche en pharmacie galénique a permis le développement de systèmes polymères implantables protégeant les substances actives d'une dégradation, et permettant leur libération locale de manière contrôlée pendant une période déterminée tout en diminuant les effets secondaires systémiques. Les avantages de ces systèmes polymères implantables ont récemment incité plusieurs équipes à étudier leur application dans les pathologies du système nerveux central (Langer R, Polymer implants for drug delivery in the brain, J. Controlled Release, 16 : 53-60, 1991). En particulier, de tels systèmes implantés dans la paroi de résection tumorale de gliomes malins retardent la récurrence tumorale et prolongent la survie des patients. Il persiste autour de la cavité opératoire des cellules malignes isolées, responsables de 90 % des récurrences, qui se produisent dans les deux centimètres du foyer opératoire. Dans cette zone, le tissu nerveux est fonctionnel et la barrière hémato-encéphalique est encore intacte, ce qui limite l'action de la radiothérapie et de la chimiothérapie conventionnelle.

Divers systèmes polymères implantables libérant des molécules actives ont été développés et testés chez l'animal.

Un système de disques biodégradables composés de PCPP-SA (poly[1,3-bis(carboxyphenoxy)propane-co-sebacic acid]) et libérant du BCNU (GLIADEL®) a été développé malgré des résultats modestes en étude clinique (Brem H, Polymers to treat brain tumors, Biomaterials 11 : 699-701, 1990 ; Brem H, Mahaley MS, Vick NA, Black KL, Schold SC, Eller TW, Cozzens JW, Kenealy JN, Interstitial chemotherapy with drug polymer implants for the treatment of recurrent gliomas, J. Neurosurg 74 : 441-446, 1991 ; Brem H, Walter KA, Langer R, Polymers as controlled

drug delivery devices for the treatment of malignant brain tumors, Eur J Pharm Biopharm, 39 (1) : 2-7, 1993 ; Brem H, Piantadosi S, Burger PC, Walker M, et al., Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent glioma, Lancet, 345 : 1008-1012, 1995).

Des microsphères libérant du BCNU ont été mises au point, mais les résultats des études chez l'animal étaient peu encourageants (Torres AI, Boisdron-Celle M, Benoit JP, Formulation of BCNU-loaded microspheres : influence of drug stability and solubility on the design of the microencapsulation procedure, J. Microencapsulation, 13 : 41-51, 1996 ; Painbèni T, Venier-Julienne MC, Benoit JP, Internal morphogogy of poly(D,L-lactide-co-glycolide) BCNU-loaded microspheres. Influence on drug stability, Eur. J. Pharm. Biopharm, 1998, 45, 31-39).

L'objet de la présente invention est l'utilisation de microsphères biodégradables implantables libérant un anticancéreux, pour le traitement du glioblastome. L'utilisation de ces microsphères est associée à la radiothérapie et à la chirurgie. Après exérèse de la tumeur, les microsphères biodégradables qui libèrent un agent anticancéreux sont implantées dans le foyer opératoire par injection intratissulaire. Ensuite, on procède à une radiothérapie, au maximum dans les sept jours suivant l'intervention.

Grâce à l'utilisation de ces microsphères, la Demanderesse a réussi de façon tout à fait avantageuse à doubler la durée de survie des patients souffrant d'un glioblastome. En effet, l'utilisation des microsphères selon l'invention permet d'atteindre une durée de survie d'au moins 90 semaines.

En conséquence, la présente invention concerne l'utilisation de microsphères biodégradables libérant un agent anticancéreux radio-sensibilisant pour la fabrication d'un médicament destiné à être utilisé de façon simultanée, séparée ou étalée dans le temps avec une radiothérapie, pour le traitement du glioblastome, lesdites microsphères

étant destinées à être implantées dans le foyer opératoire après exérèse de la tumeur gliale, caractérisée en ce que les microsphères contenant l'agent anticancéreux sont enrobées d'un polymère qui retarde la libération de l'agent anticancéreux et maintient au cours du temps une concentration thérapeutiquement efficace dans l'espace parenchymateux en vue d'atteindre une durée de survie du patient ainsi traité au moins égale à environ 90 semaines, de préférence environ 130 semaines, de préférence encore 160 semaines.

Les microsphères utilisées dans le cadre de l'invention contiennent un anticancéreux qui est de préférence hydrophile et/ou ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique. De façon avantageuse, l'agent anticancéreux ne présente pas une neurotoxicité centrale. Cet anticancéreux agit préférentiellement sur les cellules en division.

L'agent anticancéreux est constitué d'un composé anticancéreux radiosensibilisant ou d'un mélange de composés anticancéreux contenant au moins un composé anticancéreux radiosensibilisant, le ou lesdits composés anticancéreux étant par exemple choisis parmi le 5-fluorouracile (5-FU), les platines, comme le carboplatine et le cisplatine, les taxanes, comme le docétaxel et le paclitaxel, la gemcitabine, le VP16, la mitomycine, l'idoxuridine, les inhibiteurs de la topoisomérase 1, comme l'irinotécan, le topotécan et les camptothécines, les nitroso-urées, comme le BCNU, l'ACNU ou le MCNU, le méthotrexate, la bléomycine, l'adriamycine, le cytoxan et la vincristine, les cytokines immunomodulatrices, comme l'IL2, l'IL6, l'IL12 et l'IL13 et les interférons.

L'agent anticancéreux est de préférence le 5-FU.

Le 5-FU est un antimitotique ancien et bien connu. C'est une molécule hydrophile qui passe très faiblement la barrière hémato-encéphalique, son activité est donc augmentée par une administration locale (Bourke RS, West CR, Chheda G et al., Kinetics of entry and distribution of 5-fluorouracil in CSF and brain following intravenous injection in primate, Cancer Res, 33 : 1735-1746, 1973 ; Gerosa MA,

Dougherty DV, Wison CB, Rosenblum ML, Improved treatment of a brain tumor model, Part 2 : Sequential therapy with BCNU and 5-fluorouracil, J. Neurosurg. 58 : 368, 1983 ; Kotsilimbas DG, Karpf R, Meredith S, Scheinberg LC, Evaluation of parenteral 5-FU on experimental brain tumors, Neurology, 16 : 916-918, 1966 ; Levin VA, Edwards MS, Wara WM, Allen J, Ortega J, Vestnys P, 5-fluorouracil and 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) followed by hydroxyurea, misonidazole and irradiation for brain stem gliomas : a pilot study of the brain tumor research center and the children cancer group, Neurosurgery, 14 : 679-681, 1984 ; Oda Y, Tokuriki y, Tsuda E, Handa H, Kieler J, Trial of anticancer pellet in malignant brain tumours, 5-FU and urokinase embedded in silastic. Proceeding of the 6th European Congress of Neurosurgery, Acta neurochirurgica, Suppl. 28 : 489-490, 1979 ; Penn RD, Kroin JS, Harris JE, Chiu KM, Braun DP, Chronic intratumoral chemotherapy of a rat tumor with cisplatin and fluorouracil, Appl. Neurophysio, 46 : 240-244, 1983 ; Shapiro WR, Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors : Evaluation of 1-(2-Chloroethyl)-3-Cyclohexyl-1-Nitrosourea, Vinscristine and 5-Fluorouracil, J. Nat. Cancer Institute, 46(2), 359-368, 1971 ; Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Mahaley SM, A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma, J. Neurosurg, 76 : 772-781, 1992 ; Soloway AH, Mark VH, Dukat EG et al., Chemotherapy of brain tumors. I-Transplanted murine ependymoblastomas, Cancer Chemother Rep., 36 : 1-4, 1964).

L'activité du 5-FU est aussi augmentée par une administration prolongée. Le 5-FU est un agent qui agit par interférence sur la synthèse des acides nucléiques. Des études ont montré que seulement 30 à 50 % des cellules d'un gliome malin murin (L9), et 14 à 44 % des cellules d'un gliome malin humain sont en division à tout moment. De plus, les durées du cycle cellulaire du glioblastome sont longues (20 heures pour le gliome

L9, de 3 à 7 jours pour le glioblastome humain). Or, la clairance du 5-FU dans le plasma est rapide (demi-vie de 30 mn) (Neuwelt EA, Barnett PA, Frenkel EP, Chemotherapeutic agent permeability to normal brain and delivery to avian sarcoma virus-induced brain tumors in the rodent : observation on problems of drug delivery, *Neurosurgery*, 14 : 154-160, 1984). Le 5-FU ne peut donc détruire, par une administration systémique ou une injection locale, un nombre important de cellules malignes.

Le 5-FU est essentiellement actif sur les tissus à renouvellement rapide et est exceptionnellement neurotoxique. Le 5-FU intervient dans la synthèse des acides nucléiques, dont les tissus à croissance rapide ont particulièrement besoin pour assurer leur prolifération et leur régénération. Ce n'est bien sûr pas le cas du tissu cérébral où les mitoses sont rares à l'état normal et ne surviennent qu'au sein de la population gliale. Les effets toxiques du 5-FU limitant son administration par voie générale sont essentiellement hématologiques et gastro-intestinaux. Si de rares effets secondaires neurologiques du 5-FU ont été publiés, leur étiopathogénie, peu connue, est probablement multifactorielle (blocage du cycle de Krebs par un catabolite du 5-FU ou une exacerbation d'un déficit en thiamine préexistant) (Aoki N, Reversible leukoencephalopathy caused by 5-fluorouracil derivatives, presenting as akinetic mutism, *Surg Neurol*, 25 : 279-282, 1986 ; Moore DH, Fowler WC, Crumpler LS, 5-fluorouracil neurotoxicity, case report, *Gynecol Oncology*, 36 : 152-154, 1990)

Enfin, le 5-FU est radio-sensibilisant (Koutcher JA, Alfieri AA, Thaler h et al., Radiation enhancement by biochemical modulation and 5-FU, *Int. J. Radit. Biol. Phys.*, 39 : 1145-1152, 1997). La supériorité de l'association 5-FU/radiothérapie dans chacun de ces traitements isolés a été mise en évidence dès les années 60 sur des modèles animaux et sur des cellules tumorales in vitro (Bagshaw M, A possible role of potentiation in radiation therapy, *Amer J. Roentgenol*, 85 : 822-833, 1961 ; Vietti T, Eggerding F, Valeriote F, Combined effect of X-radiation and 5-fluorouracil on survival of transplanted leukemic cells, *J. Natl. Inst.*, 47 : 865-870,

1971). Cette synergie serait due à la synchronisation de la population cellulaire tumorale et à la diminution des mécanismes de réparation cellulaire par le 5-FU. L'association radiothérapie et antipyrimidine (5-FU ou BrudR) a déjà été tentée chez l'homme (Goffman TE, Dachowski LJ, Bobo H et al., Long term follow-up on national cancer institute phase I/II study of glioblastoma multiforme treated with iododeoxyuridine and hyperfractionated irradiation, J Clinical Oncology, 10 : 264-268, 1992). L'absence de franche efficacité peut encore ici s'expliquer par la voie d'administration systémique des drogues.

10 Lorsque l'agent anticancéreux est le 5-FU, la concentration en agent anticancéreux dans le liquide céphalo-rachidien, qui est le reflet de concentration dans l'espace parenchymateux, est comprise entre 3 et 20 ng/ ml.

Afin de limiter la neurotoxicité de l'agent anticancéreux contenu dans les microsphères utilisées dans le cadre de l'invention, on peut
15 avantageusement adjoindre audit agent anticancéreux un composé neuroprotecteur. Ce composé neuroprotecteur est par exemple choisi parmi les facteurs de croissance peptidiques, comme le NGF ou le BDNF.

Les microsphères biodégradables utilisées dans le cadre de l'invention sont enrobées d'un polymère qui retarde la libération de l'agent
20 anticancéreux et maintient, dans l'espace parenchymateux, une concentration thérapeutiquement efficace pendant un laps de temps d'au moins trois semaines, de préférence d'au moins quatre semaines.

Le polymère est choisi parmi l'éthylcellulose, le polystyrène, la poly(ϵ -caprolactone), le poly(d,l-acide lactique) et le poly(d,l-acide
25 lactique-co-acide glycolique).

Le polymère est de préférence le poly(d,l-acide lactique-co-acide glycolique) ou PLAGA, qui est un polymère biodégradable autorisé dans la formulation de préparations galéniques à libération prolongée (à la différence du PCPP-SA qui n'est pas agréé pour une utilisation clinique de
30 large envergure).

Le poly(d,l-acide lactique-co-acide glycolique) est de préférence du PLAGA 50 : 50 (i.e. contenant une quantité égale d'acide lactique et d'acide glycolique), par exemple Resomer® RG 506 fourni par BI Chimie, France, de masse moléculaire en masse égale à 72000, d'indice de polydispersité égal à 1,8 et de viscosité inhérente 0,80 dl/g (solution de 5 polymère à 0,1 % dans le chloroforme à 25°C).

Le PLAGA est un copolymère hydrophobe dont la dégradation, provoquée par une réaction d'hydrolyse, donne naissance à deux substrats biologiques normaux, l'acide lactique et l'acide glycolique, 10 métabolisés en fin de glycolyse aérobie en CO₂ et H₂O. Des études déjà anciennes ont montré que la voie respiratoire était la voie principale d'élimination de ces deux substrats. La vitesse de biodégradation du PLAGA dépend des proportions respectives d'acides lactique et glycolique. Le PLAGA est parfaitement biocompatible et provoque une 15 réaction modérée aux corps étrangers (Visscher GE, RL Robinson, HV Mauding, Fong JW, Pearson JE, Argentieri GJ, Biodegradation of and tissue reaction to 50 : 50 poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules, J. Biomed. Mat. Res. 19 : 349-365, 1985). Le PLAGA entre dans la composition de fils chirurgicaux (Frazza EJ, Schmidt EE, A new 20 absorbable suture, J. Biomed. Mater. Res., 5 : 43-58, 1971) et de formes galéniques implantables en sous-cutané (Jalil R, Nixon JR, Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules : problems associated with preparative techniques and release properties (Review), J. Microencapsulation, 7 : 297-325, 1990). Il a été démontré que les 25 microsphères de PLAGA 50 : 50 peuvent être stérilisées par irradiation γ , et qu'une fois implantées par stéréotaxie dans le cerveau d'un rongeur, elles sont totalement biodégradées en deux mois, ne provoquant qu'une réaction modérée de type astrocytaire et histiocytaire non spécifique (Menei P, Daniel V, Montero-Menei C, Brouillard M, Pouplard-Barthelaix A, 30 Benoit JP : Biodegradation and brain tissue reaction to poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres, Biomaterials 14 : 470-478, 1993 ; Menei P, Croue

A, Daniel V, Pouplard-Barthelaix A, Benoit JP : Fate and biocompatibility of three types of microspheres implanted into the brain, J. Biomed Mat Res, 28, 1079-1085, 1994). Ce dernier résultat a été confirmé depuis par Kou JH, Emmett C, Shen P et al., Bioerosion and biocompatibility of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) implants in brain, J Control Release, 43, 123-130, 1997.

Les microsphères biodégradables de l'invention ont de préférence un diamètre moyen de $48 \pm 20 \mu\text{m}$, de préférence $46 \pm 7 \mu\text{m}$. Elles contiennent 15 à 35 % en poids d'agent anticancéreux, de préférence de 19 à 27 % de 5-FU, de préférence encore 20% de 5-FU, et 65 à 85 % en poids de polymère.

Dans le cadre de la présente invention, les microsphères de PLAGA 50 : 50 véhiculant du 5-FU sont particulièrement préférées.

In vitro, les microsphères de PLAGA 50 : 50 véhiculant du 5-FU peuvent libérer du 5-FU pendant 21 jours. In vivo, implantées en sous-cutané chez le lapin, ces microsphères permettent d'obtenir une concentration plasmatique de 5-FU en plateau pendant 23 jours. Toujours in vivo et dans le cerveau de rongeurs, les cristaux de 5-FU sont visibles dans les microsphères au moins jusqu'au 19^{ème} jour. Chez le lapin, après implantation intra-cérébrale de microsphères de PLAGA-5-FU (7mg/kg de 5-FU), aucune trace de 5-FU n'est détectée dans le sérum, ce qui laisse suggérer un passage quasi nul de la drogue dans la circulation systémique.

Après implantation intra-cérébrale de microsphères de PLAGA-5-FU chez le rongeur, à une dose totale de 17 mg/kg de 5-FU, aucun signe de toxicité systémique, ni aucun signe de neurotoxicité clinique ou histologique n'a été observé. A la dose fractionnée de 24 Gy, l'association microsphères de 5-FU/radiothérapie cérébrale est parfaitement tolérée (Menei P, Vectorisation dans le SNC par implantation stéréotaxique de microsphères, Thèse d'Université en Sciences Pharmaceutiques, Université d'Angers, 1995). Enfin, ces microsphères implantées par

stéréotaxie au sein d'un gliome malin développé chez le rat (gliome C6), diminuent significativement la mortalité (Menei P, Boisdron-Celle M, Croue A, Guy G, Benoit JP, Effect of stereotactic implantation of biodegradable 5-fluorouracil-loaded microspheres in normal and C6-glioma bearing rats, 5 Neurosurgery, 39 : 117-124, 1996).

De façon avantageuse, les microsphères sont mises en suspension dans une solution stérile, la suspension étant injectée dans les parois du foyer opératoire après exérèse de la tumeur.

La solution stérile contient de préférence

- 10 - entre 1 et 1,5 %, de préférence 1,25 % poids/volume, d'un agent viscosifiant, par exemple la carboxyméthyl cellulose sodique,
- entre 0,5 et 1,5 %, de préférence 1 % d'un tensio-actif, par exemple le polysorbate 80®, et
- 15 - entre 3,5 et 4,5%, de préférence 4 %, d'un agent isotonisant, par exemple le mannitol.

Les microsphères sont de préférence mises en suspension de façon extemporanée juste avant injection. La suspension contient de préférence 3 ml de la solution stérile décrite précédemment et 700 à 800 mg de microsphères biodégradables.

20 Après confirmation du diagnostic de glioblastome et exérèse macroscopique de la tumeur gliale, la suspension de microsphères est implantée dans les parois du foyer opératoire, à au moins deux centimètres de profondeur, de préférence entre 2 et 3 centimètres, au moins tous les cm².

25 Lorsque l'agent anticancéreux est le 5-FU, la dose totale de suspension injectée correspond à une quantité de 5-FU comprise entre 50 et 200 mg.

La radiothérapie est focalisée sur le volume tumoral, le volume irradié englobe la tumeur préopératoire avec une marge d'au moins deux 30 centimètres dans toutes les directions, et une dose totale comprise entre 50 Gy et 60 Gy est appliquée.

La radiothérapie est amorcée de préférence entre les deuxième et septième jours consécutifs à l'opération. Une dose totale comprise entre 50 Gy et 60 Gy est étalée sur une durée comprise entre 4 et 8 semaines, par exemple à raison de 5 fractions par semaine.

- 5 La radiothérapie est de préférence effectuée avec une dose totale de 60 Gy pendant six semaines environ, de préférence encore à raison de cinq fractions par semaine pendant 6,5 semaines.

Après avoir injecté les microsphères juste après exérèse de la tumeur, une ou plusieurs nouvelles injections de microsphères peuvent
10 être effectuées par stéréotaxie en cas de récurrence de la tumeur.

Les microsphères utilisées dans le cadre de l'invention peuvent être préparées par une technique d'émulsion-extraction, selon une variante du procédé décrit par Boisdron-Celle M, Menei P, Benoit JP : Preparation of biodegradable 5-fluorouracil-loaded microspheres, J Pharm Pharmacol,
15 47, 108-114, 1995.

La présente invention concerne également un procédé de préparation des microsphères contenant un agent anticancéreux enrobées d'un polymère utilisées dans le cadre de l'invention. Les grandes étapes de ce procédé consistent à préparer une phase organique dans laquelle
20 l'agent anticancéreux et le polymère sont dispersés dans un solvant organique. La phase organique et une phase aqueuse sont mises en émulsion, puis le solvant organique est extrait par addition d'eau. Enfin, la suspension de microsphères obtenue est filtrée.

Le procédé de l'invention est tout d'abord caractérisé en ce que
25 l'agent anticancéreux est dispersé dans le solvant organique, sous vive agitation, avant l'ajout du polymère.

Selon les adaptations apportées au procédé de l'art antérieur, le principe actif est broyé dans un broyeur à bille planétaire. La taille des cristaux obtenus est comprise entre 15 et 50 μm . La taille des cristaux à
30 encapsuler et leur dispersion sont en effet des critères essentiels pour maîtriser le taux d'encapsulation et la cinétique de libération in vitro.

Le principe actif est ensuite dispersé dans un solvant organique, de préférence le dichlorométhane, dans un tube à fond rond, sous agitation à l'aide d'une tige d'homogénéisation, avant l'ajout du polymère.

L'homogénéisation permet l'obtention d'une suspension homogène, l'atténuation des différences d'un lot de broyage à l'autre et la réduction de la taille des cristaux du principe actif.

La phase organique est préparée dans un solvant sans cosolvant. L'absence de cosolvant permet de ralentir la précipitation du polymère pendant la phase d'émulsion, si bien que les particules obtenues sont moins poreuses.

La dispersion de principe actif est transvasée dans un premier réacteur.

On ajoute le polymère en une proportion massique comprise entre 8 et 13 % de préférence égale à 11%. La phase organique obtenue est maintenue sous agitation constante à température ambiante pendant 2 à 4 heures puis 15 minutes environ à une température comprise entre 1 et 5°C, de préférence égale à 2°C. Une plus longue période d'agitation de la phase organique à température ambiante assure une totale solubilisation du polymère dans le solvant.

Dans un deuxième réacteur, on prépare la phase aqueuse en la maintenant de préférence à la même température que la phase organique, de préférence à 2°C. La diminution de la température de la phase aqueuse et de la phase organique provoque une augmentation de leur viscosité et une augmentation du taux d'encapsulation. La phase aqueuse est par exemple une solution aqueuse de PVA à 10 %.

On utilise deux réacteurs à doubles parois et un liquide réfrigérant circule en série dans les deux réacteurs. La température des phases organique et aqueuse est avantageusement identique, de préférence égale à environ 2°C, quand on mélange les deux phases. Une bonne maîtrise de la température conditionne en effet à la fois la taille des

particules, la vitesse de dissolution du principe actif et la vitesse d'extraction du solvant.

La phase organique est transvasée du premier réacteur dans le second. La proportion volumique phase aqueuse / phase organique est
5 comprise entre 80/3 et 120/3, de préférence égale à 100/3.

L'émulsion obtenue est agitée pendant au moins 3 minutes, de préférence pendant 3 à 6 minutes, de manière encore plus préférée pendant 5 minutes. Le choix de cette durée est directement corrélée à la cinétique de libération et notamment à l'effet « burst » sur 24-48 heures.

10 L'absence de cosolvant couplée à une durée d'émulsion suffisante, autorise la dissolution du principe actif en surface ou mal enrobé, si bien que les cinétiques de libération dans la phase initiale sont mieux maîtrisées.

On ajoute de l'eau à l'émulsion, en un rapport volumique émulsion /
15 eau compris entre 1/4 et 1/2, de préférence égal à 1/3, pour extraire le solvant organique. La température de l'eau d'extraction est comprise entre 1 et 5°C, de préférence égale à 4°C.

Les étapes d'émulsion et d'extraction sont effectuées dans le même réacteur pour limiter la variabilité d'un lot à l'autre, et pour gagner du
20 temps. La température de l'eau d'extraction est basse pour limiter une trop forte dissolution du principe actif.

La suspension de microsphères obtenue est mélangée pendant quelques minutes puis filtrée sous atmosphère inerte. Le travail sous
25 atmosphère inerte permet de limiter les risques de contamination du produit.

Les microsphères, éventuellement obtenues selon le procédé décrit précédemment, sont avantageusement lyophilisées.

2 à 5 g de poudre (gâteau de filtration) de microsphères sont additionnés de 10 ml d'eau stérile. L'ensemble est congelé à -40 °C puis
30 introduit dans le lyophilisateur. La lyophilisation dure 18 heures. En fin de

manipulation, la température de dessiccation secondaire doit être maintenue en dessous de 10°C.

Les microsphères doivent être conservées à +4°C, même sèches.

La présente invention concerne également une suspension
5 constituée d'une solution stérile contenant 1 à 1,5 % masse/volume d'un agent viscosifiant, 0,5 à 1,5 % d'un tensio-actif et 3,5 à 4,5 % d'un agent isotonisant, et des microsphères biodégradables libérant un agent anticancéreux enrobées d'un polymère décrites précédemment éventuellement obtenues selon le procédé décrit ci-dessus, la proportion
10 des microsphères représentant 200 à 300 mg/ml de solution stérile, de préférence 230 à 270 mg/ml.

Ces microsphères sont constituées de préférence de 15 à 35% en poids d'agent anticancéreux et de 65 à 85% en poids de polymère.

Le polymère est avantageusement le poly(d,l-acide lactique-co-
15 acide glycolique) contenant de préférence une quantité égale d'acide lactique et d'acide glycolique.

La solution stérile contient de préférence 1,25 % poids/volume de carboxyméthyl cellulose sodique, 1 % de polysorbate 80 et 4 % de mannitol.

20 La présente invention est illustrée de façon non limitative par les exemples suivants.

EXEMPLE 1

25 Des microsphères préparées par la technique d'émulsion-extraction de solvant, selon une variante du procédé décrit par Boisdron-Celle M, Menei P et Benoit JP (Preparation of biodegradable 5-fluorouracil-loaded microspheres, J Pharm Pharmacol, 47, 108-114, 1995).

Broyage du 5-FU

Le 5-FU est broyé dans un broyeur à bille planétaire du type Pulvérisette 7 (Fritsch). 8,5 g de 5-FU sont introduits dans chaque jarre
5 contenant 7 billes. Le broyage dure 10 minutes à vitesse 7. La poudre est récupérée sous hotte à flux laminaire. Les cristaux obtenus ont une taille comprise entre 15 et 50 μm , et se répartissent en deux fractions : une fraction fine (de granulométrie inférieure à 1 μm) et une fraction grosse (supérieure à 30 μm).

10

Dispersion du 5-FU dans le solvant organique

Le 5-FU broyé est dispersé dans 45 ml de dichlorométhane sous agitation à l'aide d'un homogénéisateur du type ultra-turrax pendant 3
15 minutes à 13 500 tpm, dans un tube à fond rond.

Préparation de la phase organique

La dispersion de 5-FU est transvasée dans un réacteur réfrigéré
20 double paroi de 150 ml. On lui ajoute le PLAGA de telle sorte que la proportion PLAGA/dichlorométhane soit égale à 11 %. La phase organique est agitée avec une pale, à 450 tpm, pendant 4 heures à 20°C, puis 15 minutes à 2°C. Dans le réacteur la température est maintenue constante à 0,1°C près à l'aide d'un cryostat.

25

Préparation de l'émulsion

On prépare 1500 ml d'une solution aqueuse autoclavée à 10 % de PVA maintenue à 2°C dans un réacteur de 6 litres réfrigéré à double paroi.
30 La phase organique est ensuite transvasée dans ce réacteur par ouverture d'une vanne de fond du premier réacteur. La phase organique

est déversée en 5 à 10 s sur la phase aqueuse agitée à l'aide d'une pale tournant à 375 tpm. La proportion volumique phase aqueuse / phase organique est égale à 100/3.

L'émulsion est agitée pendant 4 minutes et 45 s.

5

Extraction

Lorsque l'émulsion est prête, on verse 4,5 l d'eau d'extraction à 4°C sur l'émulsion dans un rapport volumique émulsion/eau égal à 1/3.

10 L'extraction dure 2 minutes.

Filtration

La totalité du contenu du deuxième réacteur est transvasée par le
15 fond dans une cuve en inox, puis mise sous pression d'azote. La suspension est filtrée sur un filtre dont le diamètre des pores est égal à 3 µm.

Après passage de la totalité de la suspension sur le filtre, le gâteau de filtration est lavé deux fois avec 3 litres d'eau stérile.

20 Le taux d'encapsulation de l'agent anticancéreux des microsphères obtenues est de 20 %. Après tamisage, une désorption du dichlorométhane est réalisée à l'étuve pendant 48 heures. Les microsphères sont ensuite conditionnées et stérilisées par γ-irradiation à 19 kGy. Un nouveau contrôle du taux d'encapsulation est réalisé après
25 stérilisation. Un dosage des traces de solvant résiduel est ensuite effectué. On détecte avantageusement un taux résiduel de dichlorométhane de 0,5 %. On contrôle la stérilité et la cinétique de libération in vitro des microsphères obtenues.

Les microsphères obtenues ont une teneur en principe actif de 23 ±
30 3,5 %.

On réalise plusieurs lots en suivant le protocole décrit précédemment et on calcule une taille moyenne de particules de $48 \pm 20 \mu\text{m}$ sur la population de l'ensemble des lots équivalant à $46 \pm 7 \mu\text{m}$ (moyenne des moyennes des lots préparés).

- 5 Les microsphères obtenues ont une teneur en principe actif de $23 \pm 3,5 \%$ et une taille moyenne de $48 \pm 20 \mu\text{m}$.

EXEMPLE 2

- 10 Des microsphères sont préparées par la technique d'émulsion-extraction de solvant de l'exemple 1,

- Broyage du 5-FU

- 15 On procède comme dans l'exemple 1 en broyant 4 g de 5-FU

Les cristaux obtenus ont une taille comprise entre 15 et 50 μm , et se répartissent en deux fractions : une fraction fine (de granulométrie inférieure à 1 μm) et une fraction grosse (supérieure à 30 μm).

20

- Dispersion du 5-FU dans le solvant organique

- 25 Le 5-FU broyé est dispersé dans 40 ml de dichlorométhane sous agitation à l'aide d'un homogénéisateur du type ultra-turrax pendant 3,5 minutes à 13 500 tpm, dans un tube à fond rond.

- La préparation de la phase organique et la préparation de l'émulsion sont réalisées comme dans l'exemple 1.

- 30 - L'extraction et la filtration sont réalisées comme dans l'exemple 1.

- Caractéristique des microsphères obtenues.

Teneur en 5-FU : 22 %

Taille : $46 \pm 7 \mu\text{m}$

Effet burst à 24 h après radiostérilisation à 19 kGy : $40 \pm 4 \%$.

5

EXEMPLE 3

Une étude clinique pilote ouverte de phase I/II est réalisée avec les
10 microsphères PLAGA 50 : 50 / 5-FU de l'exemple 1.

Les microsphères obtenues sont mises en suspension de façon
extemporanée dans une solution contenant

- 1,25 % poids/volume de carboxyméthyl cellulose sodique
(Cooper),
- 15 - 1 % de polysorbate 80,
- 4 % de mannitol, et
- une quantité suffisante d'eau pour préparation injectable pour
obtenir un volume total de 3 ml.

La solution est préalablement stérilisée par autoclavage à 121°C
20 pendant 20 minutes, puis par radiostérilisation par gamma-irradiation à
une dose comprise entre 5 kGy et 25 kGy, de préférence 19 kGy.

La préparation de cette suspension est délicate car il faut éviter la
formation de bulles. La suspension est injectée immédiatement après sa
préparation, car les microsphères ont tendance à sédimenter dans le
25 seringue et à la boucher.

La suspension de microsphères est implantée dans les parois du
foyer opératoire, après exérèse macroscopique de la tumeur gliale, entre
deux et trois centimètres de profondeur, tous les cm^2 , à raison de 100 μl
par injection.

30 L'injection est réalisée avec une seringue de 1 ml et un cathéter
(Insys® Vialon™) de 18 ga (1,3 x 45 mm) dont on retire le mandrin

métallique pour ne garder que le cathéter en plastique à bout de mousse non biseauté pour injecter la suspension dans le tissu cérébral. On utilise autant de seringues de 1 ml que nécessaire. L'injection de la suspension avec l'aiguille biseautée expose au risque d'hématome et de reflux des microsphères. Le diamètre du cathéter doit être suffisamment petit pour ne pas traumatiser le tissu cérébral et suffisamment grand pour ne pas être bouché par la suspension de microsphères.

L'injection doit être réalisée très doucement et le cathéter doit rester quelques minutes en place avant d'être retiré pour éviter le reflux des microsphères. On applique sur le site d'injection un fragment de 1 cm² de compresse hémostatique résorbable (Surgical® ou Spongel®).

Les patients inclus dans l'étude sont âgés de 18 et 68 ans, sans antécédent néoplasique, avec un indice de Karnofsky supérieur à 60, ont une histoire clinique et une imagerie évoquant un glioblastome sustentotieriel, ont subi une exérèse macroscopiquement complète, et leur examen histologique intra-opératoire (réalisé selon les critères de l'OMS : nécrose, prolifération vasculaire, pléomorphisme nucléaire et activité mitotique) confirme le diagnostic de glioblastome.

Les critères d'exclusion des patients sont les suivants : déficience métabolique, grossesse, autre pathologie cancéreuse antérieure.

Trois groupes étaient initialement prévus pour étudier les effets de doses croissantes de 5-fluoro-uracile : dans l'ordre chronologique, 70, 132 et 264 mg, le traitement du groupe suivant étant amorcé après avoir constaté la tolérance du traitement par le groupe en cours d'essai.

En raison de la survenue d'une toxicité neurologique de Grade II chez un patient ayant reçu 132 mg de 5-FU, et suivant les règles d'arrêt du protocole, l'escalade thérapeutique a été stoppée et les patients suivants ont reçu la même dose de 132 mg.

La radiothérapie externe conventionnelle (focalisée sur le volume tumoral apprécié sur l'IRM préopératoire avec une énergie de 10 MV) est amorcée entre les deuxième et septième jours consécutifs à l'opération.

Une dose totale de 60 Gy en 33 fractions de 1,8 Gy, à raison de 5 fractions pendant 6,5 semaines, est appliquée. Le volume irradié englobe la tumeur préopératoire avec une marge d'au moins deux centimètres dans toutes les directions.

5 Les patients sont suivis sur le plan clinique et radiologique : un scanner à 72 heures pour confirmer l'exérèse macroscopiquement complète et une évaluation clinique sont effectués à J10, J20 et J30. Une IRM est réalisée à J10 et J30. Enfin, un dosage du 5-FU dans le sang et le LCR est réalisé à 72 heures, J10, J20 et J30. La toxicité (neurologique,
10 hématologique, muqueuse et cardiologique) est évaluée en grades sur des critères dérivés de ceux de l'OMS. Passé un mois, les patients sont suivis cliniquement tous les deux mois et subissent une IRM tous les trois mois.

Une légère anémie post-opératoire, une hyperleucocytose et une
15 légère lymphopénie ont été observées chez tous les patients.

L'étude pharmacologique a permis de confirmer la libération prolongée de 5-FU dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) pendant plus de 30 jours, et un passage transitoire, à plus faible taux, de la molécule dans la circulation systémique. Des concentrations significatives de 5-FU
20 sont encore présentes dans le LCR un mois après implantation.

Les profils de libération du 5-FU dans le LCR montrent un pic au dixième et au vingtième jour respectivement pour les doses de 70 et 132 mg. Le taux plasmatique de 5-FU n'était pas détectable à partir du dixième jour chez la moitié des patients.

25 La tolérance systémique est excellente chez tous les patients traités. Aucune modification de la chimie ou de la cellularité du LCR n'a été constatée. L'apparition d'un œdème cérébral durant la radiothérapie chez un patient traité avec 132 mg n'a pas permis de poursuivre l'escalade de la dose.

30 Huit patients, dont quatre hommes et quatre femmes, d'une moyenne d'âge égale à 48,5 ans et d'un indice de Karnofsky supérieur à

90, ont donc été inclus dans l'étude. Le premier groupe de trois a reçu une dose de 70 mg, et le deuxième groupe de cinq a reçu 132 mg.

Les résultats préliminaires sur la survie n'étaient pas interprétables sur le plan statistique en raison du petit nombre de patients. Ils étaient
5 cependant très encourageants. A la dernière évaluation, dans le premier groupe traité (70 mg), les trois patients sont décédés à 61, 114 et 125 semaines. A noter que le patient décédé à 114 semaines l'a été de métastases pulmonaires du glioblastome. Dans le deuxième groupe traité (132 mg), trois patients sont décédés à 31, 59 et 82 semaines et 2 étaient
10 toujours en rémission à 159 et 172 semaines, à la date d'écriture de ces résultats préliminaires.

La médiane de survie des patients est de 98 semaines (elle est de 50,6 semaines dans la littérature pour des patients répondant aux mêmes critères (Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ, Resection, biopsy, and
15 survival in malignant glial neoplasms, J Neurosurg, 78 : 767-775, 1993). Cinq patients sur huit, soit 62 % étaient vivants à 18 mois alors que dans la littérature, pour des patients répondant aux critères d'inclusion de cette étude, la survie à 18 mois est de 20 % (Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ, Resection, biopsy, and survival in malignant glial neoplasms, J Neurosurg,
20 78 : 767-775, 1993).

REVENDEICATIONS

1. Utilisation de microsphères biodégradables libérant un agent
5 anticancéreux radiosensibilisant pour la fabrication d'un médicament
destiné à être utilisé de façon simultanée, séparée ou étalée dans le
temps avec une radiothérapie, pour le traitement du glioblastome,
lesdites microsphères étant destinées à être implantées dans le foyer
opératoire après exérèse de la tumeur gliale, caractérisée en ce que
10 les microsphères contenant l'agent anticancéreux sont enrobées d'un
polymère qui retarde la libération de l'agent anticancéreux et maintient
au cours du temps une concentration thérapeutiquement efficace dans
l'espace parenchymateux en vue d'atteindre une durée de survie du
patient ainsi traité au moins égale à environ 90 semaines, de
15 préférence environ 130 semaines, de préférence encore environ 160
semaines.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'agent
anticancéreux est hydrophile et/ou ne franchit pas la barrière hémato-
20 encéphalique.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'agent
anticancéreux ne présente pas une neurotoxicité centrale.
- 25 4. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée
en ce que l'agent anticancéreux est constitué d'un composé
anticancéreux radiosensibilisant ou d'un mélange de composés
anticancéreux contenant au moins un composé anticancéreux
radiosensibilisant, le ou lesdits composés anticancéreux étant choisis
30 parmi le 5-fluorouracile (5-FU), les platines, comme le carboplatine et
le cisplatine, les taxanes, comme le docétaxel et le paclitaxel, la

gemcitabine, le VP16, la mitomycine, l'idoxuridine, les inhibiteurs de la topoisomérase 1, comme l'irinotécan, le topotécan et les camptothécines, les nitroso-urées, comme le BCNU, l'ACNU ou le MCNU, le méthotrexate, la bléomycine, l'adriamycine, le cytoxan et la vincristine, les cytokines immunomodulatrices, comme l'IL2, l'IL6, l'IL12 et l'IL13 et les interférons.

5 5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'agent anticancéreux est le 5-fluorouracile.

10

6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que la concentration en 5-FU dans le liquide céphalo-rachidien, qui est le reflet de concentration dans l'espace parenchymateux, est comprise entre 3 et 20 ng/ml.

15

7. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'on adjoint à l'agent anticancéreux un composé neuroprotecteur choisi parmi les facteurs de croissance peptidiques, comme le NGF ou le BDNF.

20

8. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le polymère enrobant les microsphères qui retarde la libération de l'agent anticancéreux maintient dans l'espace parenchymateux ladite concentration thérapeutiquement efficace pendant au moins trois semaines, de préférence au moins quatre semaines.

25

9. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le polymère est choisi parmi l'éthylcellulose, le polystyrène, la poly(ϵ -caprolactone), le poly(d,l-acide lactique) et le poly(d,l-acide lactique-co-acide glycolique).

30

10. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le polymère qui enrobe les microsphères est un poly(d,l-acide lactique-co-acide glycolique).
- 5 11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le polymère qui enrobe les microsphères est un poly(d,l-acide lactique-co-acide glycolique) contenant une quantité égale d'acide lactique et d'acide glycolique.
- 10 12. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que les microsphères ont un diamètre moyen de $48 \pm 20 \mu\text{m}$, de préférence $46 \pm 7 \mu\text{m}$.
13. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en
15 ce que les microsphères contiennent 15 à 35 % en poids d'agent anticancéreux et 65 à 85 % en poids de polymère.
14. Utilisation selon les revendications 5 et 13, caractérisée en ce que les
20 microsphères contiennent 19 à 27 % de 5-FU, de préférence 20% de 5-FU.
15. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que les microsphères sont mises en suspension dans une solution stérile, la suspension obtenue étant destinée à être injectée dans les
25 parois du foyer opératoire après exérèse de la tumeur gliale, et en ce que ladite solution stérile contient de 1 à 1,5 % masse/volume d'un agent viscosifiant, 0,5 à 1,5 % d'un tensio-actif et 3,5 à 4,5 % d'un agent isotonisant.

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que la solution contient 1,25 % poids/volume de carboxyméthyl cellulose sodique, 1 % de polysorbate 80 et 4 % de mannitol.
- 5 17. Utilisation selon la revendication 15 ou 16, caractérisée en ce que la suspension de microsphères est injectée dans les parois du foyer opératoire, à au moins deux centimètres de profondeur, de préférence entre 2 et 3 centimètres, au moins tous les cm².
- 10 18. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que la dose totale de 5-FU injectée est comprise entre 50 et 200 mg, de préférence 130 mg.
- 15 19. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la radiothérapie est focalisée sur le volume tumoral, en ce que le volume irradié englobe la tumeur préopératoire avec une marge d'au moins deux centimètres dans toutes les directions et en ce qu'une dose totale comprise entre 50 Gy et 60 Gy est appliquée.
- 20 20. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la radiothérapie est amorcée de préférence entre les deuxième et septième jours consécutifs à l'opération.
- 25 21. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la radiothérapie est effectuée avec une dose totale de 60 Gy pendant six semaines environ.
- 30 22. Utilisation selon l'une des revendications 15 à 17 ou 19 à 21, caractérisée en ce que la suspension de microsphères est injectée par stéréotaxie à une ou plusieurs reprises en cas de récurrence de la tumeur.

23. Procédé de préparation de microsphères biodégradables contenant un agent anticancéreux enrobé d'un polymère, par émulsion-extraction, qui consiste à disperser le polymère et l'agent anticancéreux dans un solvant organique, à mélanger la phase organique obtenue à une phase aqueuse pour obtenir une émulsion, à extraire le solvant organique par addition d'eau, puis à filtrer la suspension de microsphères obtenue, caractérisé en ce que l'agent anticancéreux est dispersé dans le solvant organique sous vive agitation avant l'ajout du polymère.
24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le solvant organique est le dichlorométhane.
25. Procédé selon la revendication 23 ou 24, caractérisé en ce que la phase aqueuse et la phase organique ont une température identique, de préférence égale à environ 2°C, quand elles sont mélangées.
26. Procédé selon l'une des revendications 23 à 25, caractérisé en ce que la phase organique contient 11 % de polymère.
27. Procédé selon l'une des revendications 23 à 26, caractérisé en ce que la proportion phase aqueuse/phase organique est égale à 100/3.
28. Procédé selon l'une des revendications 23 à 27, caractérisé en ce que l'émulsion constituée de la phase aqueuse et de la phase organique est mélangée pendant au moins 3 minutes.
29. Procédé selon l'une des revendications 23 à 28, caractérisé en ce que l'eau nécessaire pour extraire le solvant organique est ajoutée en une proportion telle que le rapport volumique émulsion/eau est égal à 1/3.

30. Procédé selon l'une des revendications 23 à 29, caractérisé en ce que l'eau nécessaire pour extraire le solvant organique a une température de 4°C.
- 5
31. Procédé selon l'une des revendications 23 à 30, caractérisé en ce que l'agent anticancéreux est broyé avant d'être dispersé dans le solvant organique, pour que la taille des cristaux de l'agent anticancéreux soit comprise entre 15 et 50 μm .
- 10
32. Procédé selon l'une des revendications 23 à 31, caractérisé en ce que après l'ajout de l'eau d'extraction, la suspension obtenue est filtrée sous atmosphère inerte.
- 15
33. Procédé selon l'une des revendications 23 à 32, caractérisé en ce que les microsphères sont lyophilisées.
34. Suspension constituée d'une solution stérile contenant 1 à 1,5 % masse/volume d'un agent viscosifiant, 0,5 à 1,5 % d'un tensio-actif et 3,5 à 4,5 % d'un agent isotonisant, et de microsphères biodégradables libérant un agent anticancéreux enrobées d'un polymère, la proportion des microsphères représentant 200 à 300 mg/ml de solution stérile.
- 20
35. Suspension selon la revendication 34, caractérisée en ce que les microsphères sont constituées de 15 à 35% en poids d'agent anticancéreux et de 65 à 85% en poids de polymère.
- 25
36. Suspension selon la revendication 34 ou 35, caractérisée en ce que le polymère est le poly(d,l-acide lactique-co-acide glycolique) contenant de préférence une quantité égale d'acide lactique et d'acide glycolique.
- 30

37. Suspension selon l'une des revendications 34 à 36, caractérisée en ce que la solution stérile contient 1,25 % poids/volume de carboxyméthyl cellulose sodique, 1 % de polysorbate 80 et 4 % de mannitol.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01315

A. CLASSIFICATION / SUBJECT MATTER IPC 7 A61K9/16 A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NN: "Proceedings 1997 of the 24th International Symposium on controlled release of bioactive materials" 1997, CONTROLLED RELEASE SOCIETY, INC., DEERFIELD (US) XP002129728	1-22, 34-37
Y	page 995 -page 996	23,24, 26-29, 31-33
	* référence 4 *	
Y	FR 2 693 905 A (RHÔNE MERIEUX) 28 January 1994 (1994-01-28)	23,24, 26-29, 31-33
	page 18 -page 19; example 2	
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 August 2000		Date of mailing of the international search report 31/08/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Benz, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01315

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>T. PAINBENI ET AL.: "internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) BNCU-loaded microspheres. Influence on drug stability"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, vol. 45, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 31-39, XP000727896 Amsterdam (NL) page 32, paragraph 2.2</p>	25,30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2693905 A	28-01-1994	AT 188382 T	15-01-2000
		AU 675788 B	20-02-1997
		AU 4202293 A	10-02-1994
		CA 2100925 A	28-01-1994
		DE 69327491 D	10-02-2000
		EP 0585151 A	02-03-1994
		ES 2141756 T	01-04-2000
		JP 6087758 A	29-03-1994
		NZ 248207 A	27-02-1996
		US 5540937 A	30-07-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Day 10 Internationale No. 10

PCT/FR 00/01315

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K9/16 A61P35/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NN: "Proceedings 1997 of the 24th International Symposium on controlled release of bioactive materials" 1997 , CONTROLLED RELEASE SOCIETY, INC. ,	1-22, 34-37
Y	DEERFIELD (US) XP002129728 page 995 -page 996	23,24, 26-29, 31-33
	* référence 4 *	
Y	FR 2 693 905 A (RHÔNE MERIEUX) 28 janvier 1994 (1994-01-28) page 18 -page 19; exemple 2	23,24, 26-29, 31-33
	-/--	

X Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

X Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

*L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

'&' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 août 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/08/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Benz., K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No

PCT/FR 00/01315

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>T. PAINBENI ET AL.: "internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) BNCU-loaded microspheres. Influence on drug stability"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, vol. 45, no. 1, janvier 1998 (1998-01), pages 31-39, XP000727896 Amsterdam (NL) page 32, alinéa 2.2</p>	25,30

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De: le Internationale No

PCT/FR 00/01315

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2693905 A	28-01-1994	AT 188382 T	15-01-2000
		AU 675788 B	20-02-1997
		AU 4202293 A	10-02-1994
		CA 2100925 A	28-01-1994
		DE 69327491 D	10-02-2000
		EP 0585151 A	02-03-1994
		ES 2141756 T	01-04-2000
		JP 6087758 A	29-03-1994
		NZ 248207 A	27-02-1996
		US 5540937 A	30-07-1996